

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
11. Jg. 1973, S. 20–23

Zum Zusammenhang zwischen Proteinsynthesehemmung und Induktion mikrosomaler Enzyme durch Barbitol

Von H. KRÖNER

Institut für Physiologische Chemie der Universität Düsseldorf

(Eingegangen am 13. Juni/29. September 1972)

Barbitol-Natrium bewirkt eine Hemmung der Protein- und RNA-Synthese in der Rattenleber, die zum Teil auf der alkalischen Reaktion der Injektionslösung und zum Teil auf einem Abfall der Körpertemperatur beruht. Es wird untersucht, ob durch diese Faktoren die spätere Induktion mikrosomaler Enzyme beeinflusst wird. Als Maß dienen die Hexobarbitalschlafzeit, die Dauer der Zoxazolaminlähmung und die Geschwindigkeit der Metabolisierung von Hexobarbitol und Dimethylaminophenazon durch Lebermikrosomen *in vitro*. Aufgrund der Ergebnisse muß ein Kausalzusammenhang zwischen akuter Hemmung der Proteinsynthese und späterer Enzyminduktion abgelehnt werden.

The relationship between the inhibition of protein synthesis and the induction of microsomal enzymes by barbitol

Sodium barbitol causes an inhibition of protein and RNA synthesis in rat liver, which is due partly to the alkaline reaction of the injection solution and partly to a fall in body temperature. Experiments were undertaken to determine whether these factors influence the later induction of microsomal enzymes. The criteria used were the hexobarbital sleeping time, the duration of Zoxazolamine paralysis and the rate of metabolism of hexobarbital and dimethylaminophenazone by liver microsomes *in vitro*. On the basis of the results, no causal relationship can be claimed between the acute inhibition of protein synthesis and the later enzyme induction.

Während das Phänomen der Enzyminduktion bei Mikroorganismen in den letzten Jahren zum Teil bis ins Detail aufgeklärt werden konnte (1), ist das, was bei höheren Organismen mit diesem Terminus bezeichnet wird, noch reichlich undurchsichtig. Unsere Vorstellungen über die Induktion durch Hormone beruhen noch weitgehend auf Analogieschlüssen zu Abläufen bei Bakterien.

Fast noch unbefriedigender erscheinen die Aspekte, die sich ergeben, wenn man die „Induktion“ mikrosomaler, Drogen abbauender Enzyme in der Leber von Säugtieren betrachtet. Die Zahl der Substanzen unterschiedlichster chemischer Struktur ist nicht abzusehen (2), die im Tierexperiment meist innerhalb weniger Tage über eine gesteigerte RNA- und Proteinsynthese (3, 4, 5) zu einer Aktivitätszunahme jener mikrosomalen Enzyme führt. Die Aufklärung dieses Induktionsmechanismus erscheint besonders deshalb schwierig, weil irgendwelche Gemeinsamkeiten der induzierenden Pharmaka kaum zu erkennen sind, es sei denn, man hält die relativ gute Fettlöslichkeit der meisten Substanzen für ausreichend.

Die früher beschriebene akute Hemmung der Protein- und RNA-Synthese durch Barbitol-Natrium (6) und die Beobachtung anderer Autoren (7, 8, 9), daß Substanzen, die primär die Proteinsynthese hemmen, sekundär eine Induktion hervorrufen, ließen den Gedanken an einen Zusammenhang zwischen primärem Hemmeffekt und sekundärer Auslösung einer Induktion aufkommen (10), wobei ein solcher Kausalzusammenhang nicht auf Barbitoleffekte beschränkt sein müßte, sondern auch zur Erklärung der Enzyminduktion durch andere Pharmaka beitragen könnte.

Die akute Hemmung der Proteinsynthese durch Barbitol-Natrium beruht zum Teil auf einem Abfall der Körpertemperatur (11), zum Teil auf der Alkalinität des Präparates (12). Werden diese beiden Effekte durch Neutralisation der Injektionslösung und Unterbringung der Tiere bei erhöhter Raumtemperatur während des Versuches ausgeschaltet, so ist damit auch weitgehend die Hemmung der Proteinsynthese durch Barbitol aufgehoben. Ein Vergleich der Enzyminduktion bei zwei Kollektiven, von welchen bei einem die akute Proteinsynthesehemmung ausgeschaltet wurde, soll die Frage nach dem Zusammenhang beider Phänomene beantworten. Das Ausmaß der Induktion mikrosomaler Enzyme wird *in vivo* erfaßt durch die Hexobarbitalschlafzeit und die Dauer der Zoxazolaminlähmung. *In vitro* wird die Abbaurate von Hexobarbitol und Dimethylaminophenazon durch Lebermikrosomen gemessen.

Methodik

Die Untersuchungen wurden an weiblichen Wistar-Ratten der Firma Brünger, Bokel, durchgeführt, mit Ausnahme einer Versuchsserie, bei der männliche Versuchstiere verwendet wurden. Die Tiere erhielten Standardfutter der Firma Höveler, Langenfeld-Immigrath, und Wasser *ad libitum*. Auf ein möglichst einheitliches Körpergewicht in den Versuchsserien wurde besonderer Wert gelegt.

Die Versuchstiere wurden jeweils in drei Kollektive unterteilt: Kollektiv A erhielt an drei aufeinanderfolgenden Tagen eine i. p. Injektion von Barbitol-Natrium (Veronal, Firma Merck) 150 mg/kg Ratte. Von der Substanz wurden 15 g/l in physiol. NaCl-Lösung gelöst. Während dieser Behandlung wurden die Tiere bei einer Raumtemperatur von etwa 20°C gehalten.

Kollektiv B erhielt ebenfalls eine i. p. Injektion von Barbitol-Natrium in gleicher Dosierung, jedoch wurde die zu injizierende Lösung mit verdünnter Salzsäure auf pH 7,2 eingestellt. Während

der dreitägigen Behandlung wurden diese Tiere bei einer Raumtemperatur von 32°C gehalten.

Das dritte Kollektiv, die Kontrolltiere, erhielten entsprechende Mengen physiol. NaCl-Lösung i. p. injiziert und wurden bei Raumtemperatur (20°C) gehalten.

Zur Bestimmung der Hexobarbital-Schlafzeit (13) erhielten männliche Tiere (mittleres Tiergewicht 200 g) eine i. p. Injektion von 200 mg Hexobarbital-Natrium (Evipan-Natrium Firma Bayer) pro kg, weibliche Tiere (mittleres Körpergewicht 180 g) bekamen eine Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht. Während der Schlafzeit waren alle Tiere in einem auf 32°C temperierten Raum untergebracht.

Die Dauer der Zoxazolamin-Lähmung (14) wurde bei weiblichen Ratten (mittleres Tiergewicht 200 g) nach i. p. Injektion von 100 mg 2-Amino-5-chlorbenzoxazol (Firma Schuchardt) je kg Körpergewicht gemessen. Auch dieser Versuch wurde bei 32°C Raumtemperatur durchgeführt.

Zur Messung des Arzneimittellabbaues in vitro wurden weibliche Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von 110 g nach entsprechender dreitägiger Vorbehandlung mit Äther narkotisiert, die Lebern mit eiskalter 0,25 mol/l Saccharoselösung von der Pfortader in situ durchspült, die Lebern entnommen und im PORTER-ELVEHJEM-Homogenisator mit vier Teilen kalter 0,25 mol/l Saccharoselösung homogenisiert. Nach Abzentrifugieren der Kerne und Mitochondrien, 10 min 800 g und 20 min 15000 g, wurde in der Ultrazentrifuge Spinco L 2, Firma Beckman, in einer Stunde bei 105000 g die Mikrosomenfraktion gewonnen. Diese Mikrosomen wurden mit Hexobarbital (Evipan-Natrium, Firma Bayer) oder Dimethylaminophenazon (4-Dimethylamino-2,3-dimethyl-1-phenylpyrazolon (Firma Merck) als Substrat und einem NADPH regenerierenden System nach CONNEY (14) inkubiert (Reagenzien der Firma Boehringer). Nach einstündiger Inkubation im Schüttelthermostat bei 37°C unter Luftzutritt wurde die Abnahme von Hexobarbital (15) bzw. das aus Dimethylaminophenazon entstandene 4-Aminoantipyrin (16) gemessen. Eichsubstanz für diese Messung war 1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-aminopyrazolon-(5) der Firma Merck. Die Bestimmung des Leberglykogens erfolgte nach einer modifizierten PFLÜGER-Methode mit dem Anthronreagenz (17). Die Bestimmung des Leberproteingehaltes wurde mit dem Biuret-reagenz nach WEICHSELBAUM (18) durchgeführt.

Ergebnisse

Die Narkosedauer nach einer einmaligen Injektion von Hexobarbital, 200 mg/kg, ist bei erwachsenen männlichen Ratten im Mittel um 40% verkürzt, wenn die Tiere drei Tage lang mit Barbitol-Natrium, 150 mg/kg/Tag vorbehandelt wurden (Tab. 1). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant, unabhängig davon, ob die Barbitollösung auf einen physiologischen pH-Wert gebracht wird oder

nicht und unabhängig davon, ob die Tiere während der Vorbehandlung bei einer Raumtemperatur von 20°C oder 32°C gehalten wurden.

Weibliche Ratten schlafen nach einer halb so großen Hexobarbitaldosis — 100 mg/kg i. p. — im Mittel annähernd doppelt so lange wie männliche Tiere mit der doppelten Dosis. Die Schlafzeit wird bei weiblichen Tieren durch Vorbehandlung mit Barbitol-Natrium stärker verkürzt als bei männlichen Ratten. Werden die weiblichen Tiere mit der alkalischen Barbitol-Natrium-Lösung vorbehandelt und während der Vorbehandlung bei 20°C Raumtemperatur gehalten, so ist die Narkosedauer fast auf $\frac{1}{3}$ verkürzt. Wird die Barbitol-Natrium-Lösung dagegen neutralisiert und die Tiere während der Vorbehandlung bei 32°C Raumtemperatur gehalten, so wird die Narkosedauer nur auf etwa die Hälfte verkürzt. Diese Differenz der Schlafzeit der beiden Kollektive mit unterschiedlicher Vorbehandlung ist statistisch nicht signifikant ($p \sim 0,1$), die Schlafzeitverkürzung gegenüber dem Kontrollkollektiv ist in beiden Fällen statistisch signifikant (Tab. 1).

Die Dauer einer Zoxazolamin-Lähmung wird durch die Vorbehandlung prinzipiell ähnlich beeinflusst wie die Hexobarbitalschlafzeit. Beide mit Barbitol-Natrium vorbehandelten Kollektive unterscheiden sich durch eine signifikant kürzere Lähmungsdauer von den unbehandelten Kontrollen. Bei den Tieren des Kollektives A (mit alkalischer Barbitol-Natrium-Lösung bei Raumtemperatur (20°C) behandelt) war die Verkürzung zwar ausgeprägter, doch bestand kein signifikanter Unterschied zum Kollektiv B (mit neutralisiertem Barbitol-Natrium bei 32°C Raumtemperatur behandelt) (Tab. 1).

Die in vitro gemessene Aktivität mikrosomaler, Arzneimittel abbauender Enzyme steigt während der dreitägigen Behandlung mit Barbitol-Natrium signifikant um etwa 100% (Abb. 2). Sowohl der Abbau von Hexobarbital als auch die Demethylierung von Dimethylaminophenazon sind entsprechend beschleunigt. Bei der letzteren Versuchsserie erscheint die Behandlung mit neutralisierter Barbitol-Natrium-Lösung bei 32°C Raumtemperatur einen etwas größeren Effekt zu haben, doch ergeben sich auch hier keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden unterschiedlich vorbehandelten Kollektiven.

Tab. 1

Einfluß einer dreitägigen Vorbehandlung mit Barbitol auf die Hexobarbitalschlafzeit und die Zoxazolaminlähmung am 4. Tag. Angabe der Zeiten in Minuten \pm Standardabweichung

n = Zahl der Versuchstiere, p = Irrtumswahrscheinlichkeit gegenüber Kontrollen

Vorbehandlung	Physiol. NaCl 20°C Raumtemperatur (Kontrollen)	Barbitol-Na 150 mg/kg 20°C Raumtemperatur A	Barbitol, pH 7,2 150 mg/kg 32°C Raumtemperatur B
Schlafzeit [min] Hexobarbital 200 mg/kg männliche Tiere	77,0 \pm 19,3 (n = 8)	43,0 \pm 11,3 (n = 6) p < 0,01	49,5 \pm 11,9 (n = 8) p < 0,01
Schlafzeit [min] Hexobarbital 100 mg/kg weibliche Tiere	150,5 \pm 52,5 (n = 11)	54,2 \pm 25,0 (n = 11) p < 0,001	69,2 \pm 17,7 (n = 12) p < 0,001
Zoxazolamin-Lähmung [min] 100 mg/kg weibliche Tiere	220,5 \pm 69,9 (n = 11)	128,9 \pm 31,9 (n = 10) p < 0,01	159,4 \pm 68,1 (n = 11) p \sim 0,05

Tab. 2

Einfluß einer dreitägigen Vorbehandlung mit Barbitol in vivo auf die Metabolisierung von Hexobarbital und Dimethylaminophenazon in vitro durch Rattenlebermikrosomen. Angaben in μmol Substratumsatz pro g Frischleber und Stunde
 n = Zahl der Messungen, p = Irrtumswahrscheinlichkeit gegenüber Kontrollen. Einzelheiten siehe Methodik

Vorbehandlung	Physiol. NaCl 20°C Raumtemperatur (Kontrollen)	Barbitol-Na 150 mg/kg 20°C Raumtemperatur A	Barbitol, pH 7,2 150 mg/kg 32°C Raumtemperatur B
Abbau von Hexobarbital [$\mu\text{mol/h} \cdot \text{g}$]	$0,27 \pm 0,07$ (n=6)	$0,63 \pm 0,15$ (n=6) p < 0,001	$0,60 \pm 0,14$ (n=6) p < 0,001
Demethylierung von Dimethyl- aminophenazon [$\mu\text{mol/h} \cdot \text{g}$]	$0,036 \pm 0,018$ (n=9)	$0,062 \pm 0,030$ (n=9) p < 0,05	$0,077 \pm 0,022$ (n=8) p < 0,001

Tab. 3

Einfluß einer dreitägigen Vorbehandlung mit Barbitol auf das Leberfrischgewicht, das Trockengewicht, den Glykogen- und Proteingehalt der Leber gefütterter Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von 110 g
 Mittelwert von n Bestimmungen \pm Standardabweichung, p = Irrtumswahrscheinlichkeit gegenüber Kontrollen

Vorbehandlung	Physiol. NaCl 20°C Raumtemperatur (Kontrollen)	Barbitol-Na 150 mg/kg 20°C Raumtemperatur A	Barbitol, pH 7,2 150 mg/kg 32°C Raumtemperatur B
Leberfrischgewicht gefütterter Ratten [g]	$6,12 \pm 1,26$ (n=12)	$6,53 \pm 0,85$ (n=11)	$5,80 \pm 1,04$ (n=12)
Glykogengehalt [mg/g Leberfrischgewicht]	$64,0 \pm 12,0$ (n=6)	$48,7 \pm 13,1$ (n=6)	$40,9 \pm 19,1$ (n=6) p < 0,05
Proteingehalt [mg/g Leberfrischgewicht]	283 ± 16 (n=6)	291 ± 34 (n=6)	288 ± 19 (n=6)
Lebertrockengewicht [% vom Frischgewicht]	$30,8 \pm 0,8$ (n=6)	$30,0 \pm 2,2$ (n=6)	$30,5 \pm 0,8$ (n=6)

In Tabelle 3 sind einige allgemeine, die Leber der Versuchstiere betreffende Parameter zusammengestellt. Eine statistisch signifikante Differenz ergibt sich nur zwischen dem Glykogengehalt der mit neutralisierter Barbitol-Natrium-Lösung bei 32°C behandelten Ratten und dem Glykogengehalt der Kontrolltiere. Es sei ferner hingewiesen auf die unterschiedliche Entwicklung des Leberfrischgewichtes bei den beiden unterschiedlich behandelten Kollektiven: im einen Fall eine geringe Zunahme, im anderen eine geringe Abnahme gegenüber den Kontrollen, wobei betont werden muß, daß diese Differenzen statistisch nicht zu sichern waren.

Diskussion

Für den Zusammenhang zwischen einer akuten Hemmung von Protein- und RNA-Synthese und einer anschließenden Enzyminduktion bestehen prinzipiell zwei Möglichkeiten. Zum einen ist es charakteristisch für Induktionen, daß sie sich durch Hemmung der Protein- oder RNA-Synthese ganz oder teilweise blockieren lassen (19). Das trifft auch für Barbitol-Natrium zu, indem es sowohl die Induktion der Tryptophanpyrrolase (EC 1.13.1.12) durch Cortisol als auch die Induktion der Serindehydratase (EC 4.2.1.16) durch Aminosäuren hemmt (20). Zum anderen wurde einleitend schon auf die Möglichkeit hingewiesen, daß die „Induktion“ eine Folge des akuten Hemmeffektes sein könnte (7, 8, 9). Zu denken wäre in diesem Zusammenhang zunächst an die Atmungshemmung oder die Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung durch viele induzierende Pharmaka (10). Darüber hinaus ist von vielen dieser

Substanzen eine biphasische Wirkung beschrieben, deren primäre Hemmphase aber auf einer direkten Wirkung dieser Substanzen auf die mikrosomalen Enzyme beruhen dürfte (21, 22, 23, 24, 25).

Die zunächst durchgeführten Versuche in vivo zum Zusammenhang zwischen Hemmeffekt und Induktionswirkung von Barbitol lassen an die zweite Möglichkeit denken: Bei weitgehender Aufhebung der Barbitolhemmung durch Neutralisation der Injektionslösung und Unterbringung der Tiere bei erhöhter Raumtemperatur erscheint die Induktionswirkung geringer. Die Verkürzung der Hexobarbitalschlafzeit bzw. der Zoxazolaminlähmung ist nicht so ausgeprägt. Diese Differenzen sind aber nicht statistisch gesichert. Die weitere Überprüfung durch Messung von Enzymaktivitäten in vitro macht einen Zusammenhang zwischen Proteinsynthesehemmung und Induktionswirkung von Barbitol ganz unwahrscheinlich. Die Aktivität der mikrosomalen Enzyme ist bei Aufhebung des primären Hemmeffektes sicher nicht geringer. Nun sind diese Enzymaktivitäten auf das Lebergewicht bezogen. Berücksichtigt man, daß dieses Lebergewicht (Tab. 3) bei dem Kollektiv B (mit neutralisierter Barbitollösung behandelte, bei erhöhter Raumtemperatur untergebrachte Tiere) geringer ist als bei den anderen Tieren, und bezieht die Enzymaktivität auf das Tiergewicht, so erhält man das gleiche Ergebnis wie bei den in vivo Versuchen. Da aber auch die Differenzen im Lebergewicht nicht statistisch zu sichern sind, muß ein Kausalzusammenhang zwischen akuter Proteinsynthesehemmung und sekundärer Induktion mikrosomaler Enzyme durch Barbitol abgelehnt werden.

Literatur

1. MÜLLER-HILL, B. (1971), *Angew. Chem.* **83**, 195—207. — 2. CONNEY, A. H. (1967), *Pharmacol. Rev.* **19**, 317—366. — 3. KUNZ, W., SCHAUDE, G., SCHIMASSEK, H., SCHMID, W. & SIESS, M. (1966), *Proceedings of the European Society for the study of drug toxicity* Vol. VII, 138—153. — 4. KATO, R., JONDORF, W. R., LOEB, L. A., BEN, T. & GELBOIN, H. V. (1966), *Mol. Pharmacol.* **2**, 171—186. — 5. GELBOIN, H. V. (1965), *Exp. Med. Surg.* **23**, 85—103. — 6. KRÖNER, H., GUTENBERGER, B., HOLLMANN, S. & STAIB, W. (1969), *diese Z.* **7**, 8—13. — 7. JONDORF, W. R., SIMON, D. C. & AVNIMELECK, M. (1966), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**, 644—649. — 8. ROSEN, F., RAJNA, P. N., MILHOLLAND, R. J. & NICHOL, CH. A. (1964), *Science (Washington)* **146**, 661—663. — 9. FIALA, S. & FIALA, E. S. (1967), *Science* **157**, 1591. — 10. HOLLMANN, S. & NEUBAUER, J. (1967), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **348**, 877—881. — 11. KRÖNER, H. & STAIB, W. (1970), *diese Z.* **8**, 41—44. — 12. KRÖNER, H., RUDORFF, K.-H. & STAIB, W. (1970), *diese Z.* **8**, 456—468. — 13. REMMER, H. (1963), *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Exp. Pathol.* **244**, 311—333. — 14. CONNEY, A. H., DAVISON, C., GASTEL, R. & BURNS, J. J. (1960), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **130**, 1—8. — 15. BRODIE, B. B., BURNS, J. J., MARK, L. C., LIEF, P. A., BERNSTEIN, E. & PAPPER, E. M. (1953), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **109**, 26—34. — 16. BRODIE, B. B. & AXELROD, J. (1950), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **99**, 171—184. — 17. HASSID, W. Z. & ABRAHAM, S. (1957), in *Methods in Enzymology* (COLOWICK, S. P. & KAPLAN, N. O. ed.) Vol. III, S. 34—50, Academic Press New York. — 18. WEICHSELBAUM, T. E. (1946), *Amer. J. Clin. Pathol.* **16**, 40—49. — 19. NEUBERT, D. (1966), *Internist* **7**, 435—454. — 20. KRÖNER, H., BOJAR, H.-E., HOLLMANN, S. & STAIB, W. (1970), *diese Z.* **8**, 45—48. — 21. BRAZDA, F. G. & BAUCUM, R. (1961), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **132**, 295—298. — 22. REMMER, H. (1962), *Proc. 1st Int. Pharmacol. Meeting Stockholm* (Brodie, B. B. ed.) Vol. 6, p. 235—256, Mac Millan, New York. — 23. SERRONE, D. M. & FUJIMOTO, J. M. (1962), *Biochem. Pharmacol.* **11**, 609—615. — 24. RÜMKE, C. L. (1963), *Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Exp. Pathol.* **244**, 519—530. — 25. KATO, R., CHIESARA, E. & VASSANELLI, P. (1964), *Biochem. Pharmacol.* **13**, 69—83.

Privatdozent Dr. H. Kröner
4000 Düsseldorf
Moorenstr. 5